

(4)

L1 ANSWER 1 OF 3 WPINDEX (C) 2002 THOMSON DERWENT  
AN 1995-009103 [02] WPINDEX  
DNN N1995-007491 DNC C1995-003259  
TI Medical material, having high bio affinity and absorbability after  
grafting - comprises biodegradable absorbable material coated with layer  
of collagen.

DC A96 D22 P32 P34  
PA (SHIM-I) SHIMIZU Y

CYC 1

PI JP 06292716 A 19941021 (199502)\* 5p A61L027-00 <--

ADT JP 06292716 A JP 1993-107726 19930409

PRAI JP 1993-107726 19930409

IC ICM A61L027-00

ICS A61F002-00; A61L033-00

AB JP 06292716 A UPAB: 19950117

The medical material has a coated layer of collagen on the surface of a  
biodegradable absorbable material (s).

Pref. the material is polyglycolic acid, glycolic acid-lactic acid  
copolymer or a mixt. of polyglycolic acid and polylactic acid. Pref. the  
coated layer is porous. Pref. the collagen is an alkali- or an  
enzyme-solubilised collagen.

USE - The material allows host cells to enter the coated layer while  
retaining the mechanical strength. After grafting, the material is  
degraded and absorbed in the body, leaving no foreign matter. It is highly  
safe.

Dwg.0/0

FS CPI GMPI

FA AB; GI

MC CPI: A03-C01; A05-E02; A09-A07; A12-V02; D09-C01



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-292716

(43)公開日 平成6年(1994)10月21日

(51)IntCl <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 L 27/00	V	7252-4C		
A 6 1 F 2/00		9361-4C		
A 6 1 L 33/00	T	7252-4C		

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平5-107726

(22)出願日 平成5年(1993)4月9日

(71)出願人 593155754

清水 慶彦

京都市左京区聖護院川原町53 京都大学生  
体医療工学研究センター

(72)発明者 夏目 徹

茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハ  
ム株式会社中央研究所内

(72)発明者 牧原 俊和

茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハ  
ム株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 医用材料

(57)【要約】

【目的】 人工器官、人工臓器などに利用され、生体親和性などに優れ且つ移植後生体に吸収され得る医用材料を提供することを目的とする。

【構成】 本発明の医用材料は、生体内分解吸収性材料の表面にコラーゲンの被覆層が形成されていることからなる。本発明によれば、生体内に移植した際に、宿主細胞がコラーゲン被覆層に侵入し、増殖して自己修復が行われる。その間、生体内分解吸収性材料は機械的強度を維持し、自己修復を支持する。そして、移植の目的が達成された後には、コラーゲン及び生体内分解吸収性材料は吸収されてしまい、生体内に異物として残存することがない。従って、極めて安全性が高く且つ利用範囲の広い医用材料が得られる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 生体内分解吸収性材料の表面にコラーゲンの被覆層が形成されていることを特徴とする医用材料。

【請求項2】 生体内分解吸収性材料が、ポリグリコール酸、グリコール酸と乳酸との共重合体又はポリグリコール酸とポリ乳酸の混合物である請求項1記載の医用材料。

【請求項3】 コラーゲンの被覆層が、多孔質状である請求項1又は2記載の医用材料。

【請求項4】 コラーゲンが、アルカリ可溶化コラーゲン又は酵素可溶化コラーゲンである請求項1から3のいずれかに記載の医用材料。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は医用材料に関する。より詳細には、生体内分解吸収性材料とコラーゲンとからなり、人工器官、人工臓器などに利用される医用材料に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 生体組織などに異常が生じたり、機能不全となった場合に、人工物をもってそれを代替することは古くから考えられており、従来から、血管、気管、食道、弁、各種臓器などに合成高分子材料（例えば、シリコーン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン、ナイロン等）、生体由来材料などを用いることが検討されている。このような医用材料においては、生体親和性のあること、血液などの体液や組織に対する適合性があること、毒性や抗原性のないこと、移植部位によっては所定の機械的強度のあることなどの種々の条件が要求される。一般に、移植後、所期の目的を達成したのちに、生体に吸収されるか又は生体と同化するものが好ましいとされており、この点で合成高分子材料は生体内に異物として残存し、肉芽形成、炎症などの障害を生じ易い問題があり、また組織適合性に欠けるので移植した組織から脱落し易い欠点もある。また、生体由来材料においては、移植に伴う障害や免疫反応による障害が生ずる問題がある。例えば、尿路再建術、特に膀胱拡大術や膀胱全摘出術に伴う代用膀胱造設には一般的に腸管が用いられる。しかし、腸管を用いた術式は術後の腸閉塞や移植した腸管が尿を再吸収してしまうことによる高塩素性酸血症などの合併症に常に悩まされる問題がある。また、シリコーン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレンなどの合成高分子材料を用いる試みも多数されたが、これらは尿路における異物となるため全く成功することがなかった。

【0003】 このように、従来から用いられている医用材料には解決すべき多くの問題があり、満足できる材料は極めて少ないが、生体由来材料であるコラーゲンは生体親和性及び組織適合性に優れ、抗原性が低く、更に生

体内で安全に吸収されることから、医用材料の素材としては理想的であると考えられており、これを用いた医用材料が活発に研究されている。コラーゲンは上記の特性のほか、細胞培養の培地として利用されているように宿主細胞の伸展・増殖を促進させる作用を有し、さらにコラーゲンは止血作用をも有しており、この点からも好ましい素材と考えられている。このように、コラーゲンは医用材料の素材として優れた特性を有し、特にコラーゲンを多孔質状としたコラーゲンスポンジはコラーゲン層内に細胞が侵入し、活発に増殖して組織の再生を図ることができるので有用な材料であり、既に創傷治癒などに利用できることが明らかにされている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、コラーゲンスポンジは機械的強度が低く、利用できる範囲が制限される。一般的にコラーゲン単独では、細胞侵入性や増殖性が高く且つある程度の機械的強度を有する材料に成形することが困難である。そのため、従来は、合成高分子材料（例えば、シリコーン等）とのコンポジットとして使用されていたが、このような材料を生体内に移植すると、合成高分子材料が異物として生体内に残存し、組織反応を起しつづけるなどの好ましくない障害をもたらすことが多い。そこで、最終的には合成高分子材料を抜去することが望ましいが、そのために再手術又は内視鏡術で抜去する必要がある、なによりも移植部位によっては抜去することができない場合がある。このように問題から、コラーゲンは医用材料の素材として優れた特性を有するにもかかわらず、利用されているケースは少なかった。本発明は、上記従来技術の問題を解消するためになされたもので、本発明の目的は、コラーゲンの特性を有効に発揮し得ると共に移植後生体に吸収され得る医用材料を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決するために、医用材料としての諸条件を満足し且つ移植後に生体内に残存しない医用材料を鋭意研究した結果、生体内分解吸収性材料とコラーゲンを組み合わせることにより、医用材料として極めて優れた性状を有する材料を得ることができることを見出して本発明を完成した。すなわち、本発明の医用材料は、生体内分解吸収性材料の表面にコラーゲンの被覆層（以下、コラーゲン被覆層という）が形成されていることからなる。なお、コラーゲン被覆層は多孔質状に形成されているものが好ましく、またコラーゲンとしては抗原性が低減されたアルカリ可溶化コラーゲン又は酵素可溶化コラーゲンが好ましい。

【0006】 上記の構成からなる本発明において、ここで用いられる生体内分解吸収性材料としては、生体内で加水分解、酵素分解などにより分解し吸収され、ある程度の機械的強度を有するものであれば種々の材料を用い

ることができるが、好適にはポリグリコール酸、グリコール酸と乳酸との共重合体、ポリグリコール酸とポリ乳酸との混合物などが例示される。これらの材料の形態としては、例えば、フィルム、シート、メッシュシート、織物、不織布などが例示され、これらの材料の調製方法は、特開昭57-98556号公報、特公平5-18579号公報などに詳述されている。これらの形態において、コラーゲン被覆層の形成の容易性、生体内での分解性、伸縮性などから、不織布、織物及びメッシュシート（孔径200～300 $\mu$ m程度が好ましい）が好適に使用される。なお、生体分解吸収性材料は、生体組織やコラーゲン溶液との親和性を高めるため、親水化処理を行うのが好ましく、親水化処理としてはプラズマ照射などが例示される。

【0007】上記の生体内分解吸収性材料上にはコラーゲン被覆層が形成される。コラーゲン被覆層は、生体内分解吸収性材料の一面のみに形成してもよく、また両面に形成してもよい。コラーゲン被覆層の原料となるコラーゲンとしては、従来から用いられている各種コラーゲンをを用いることができ、例えば、中性塩可溶性コラーゲン、酸可溶性コラーゲン、アルカリ可溶化コラーゲン、酵素可溶化コラーゲンなどが例示される。これらのうち、アルカリ可溶化コラーゲン及び酵素可溶化コラーゲンは、不溶性コラーゲンを、それぞれアルカリ処理又は酵素（例えば、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パバイン、プロナーゼ等）処理したもので、これらの処理によりコラーゲン分子中の抗原性の強いテロペプチド部分が除去されており、抗原性が低減されているので、好適に使用される。上記のコラーゲンの由来は特に限定されず、一般に哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、ネズミ等）の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器などから得られるコラーゲンが用いられる。また、魚類、鳥類などから得られるコラーゲン様蛋白も用いることができる。

【0008】生体内分解吸収性材料上へのコラーゲン被覆層の形成は、コラーゲン溶液の塗布、流し込みなどの慣用の方法にて、生体内分解吸収性材料上へコラーゲン溶液層を形成し、次いで凍結乾燥などの手段によりコラーゲン溶液層を固着化させることにより行うことができる。コラーゲン溶液層の厚さは、最終的に固着化したコラーゲン被覆層の厚さが2mm～20mm程度、好ましくは5mm～10mm程度となるように調整される。コラーゲン被覆層の厚さが2mm未満であると、生体内でのコラーゲンの吸収が速く、十分な効果が得られず、また20mmを超えても効果的には格別の問題はないが、作業性などの点で問題を生ずるおそれがある。コラーゲン被覆層は、生体内に移植したときに細胞の侵入・伸展・増殖が容易になるように、多孔質状に形成するのが好ましい。ここで使用されるコラーゲン溶液の濃度は、所望するコラーゲン被覆層の厚さ、密度などにより適宜調

整することができるが、通常、0.1～5%（w/v、以下同様）程度、好ましくは0.5～2%程度とされる。なお、この際、コラーゲン被覆層を多孔質状（スポンジ状）とする場合には、コラーゲン溶液は攪拌して起泡させたものが用いられる。また、上記の凍結乾燥は常法に準じて行うことができる。この際、コラーゲン被覆層の強度を高めるため、凍結乾燥に先立ち、コラーゲンを線維化しておくのが好ましく、この線維化は、コラーゲン溶液のpHの変化（例えば、酸性溶液の中和等）、温度上昇などにより行うことができる。かくして、生体内分解吸収性材料の表面にコラーゲンの被覆層が形成された本発明の医用材料が得られる。

【0009】上記で得られた本発明の医用材料は、生体に移植した際のコラーゲンの吸収が早すぎないように、必要に応じてコラーゲンを架橋処理するのが好ましい。コラーゲンの架橋処理は、グルタルアルデヒドなどの架橋剤を用いた架橋法でも行うことができるが、架橋剤の毒性などの問題がある。一方、コラーゲンの架橋処理は $\gamma$ 線照射や紫外線照射によっても行うことができるが、前者は放射線照射施設を必要とし、後者では軽度の架橋度しか得られない問題がある。所望する架橋度を得るには、減圧下で加熱処理を行う加熱架橋法が好ましい。加熱処理法としては、減圧下（通常、0.1 Torr以下）、加熱（例えば、90～170℃程度、好ましくは100～160℃程度）し、脱水して架橋させる方法が用いられる。加熱時間は、加熱温度、減圧度、所望する架橋度などにより適宜調整されるが、通常、10～100時間程度とされる。なお、コラーゲンの加熱架橋は、主として、コラーゲン分子中の糖鎖や酸化により生じたアルデヒド基と、コラーゲン分子中のリジンやヒドロキシリジンなどとの Schiff 塩基形成、アルドール縮合等により進行すると考えられている。かかる点を勘案すると、ブタ由来のコラーゲンは糖鎖含有量が多く、架橋構造を形成し易いので特に好適に用いられる。

【0010】本発明の医用材料は、従来から検討されている各種の人工器官、人工臓器などに応用することができ、特に生体内で分解吸収されるので、生体内に埋設される人工器官、人工臓器などに好適に用いられる。これらの器官、臓器としては、例えば、膀胱、消化管、腹膜、胸壁、縦隔、気管などの軟組織が挙げられ、また縫合面の補強などにも利用することができる。

#### 【0011】

【実施例】以下、実施例及び試験例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

#### 実施例1

下記の方法で、本発明の医用材料を調製した。

① 特公平5-18579号公報に記載の方法に従って、ポリグリコール酸（以下、PGAという）不織布を調製した。即ち、熔融紡糸法で得た、12フィラメント

35デニールのPGA糸を106℃で3時間熱処理し、筒編機にて編成しチューブ状の平編み生地を得た。これを4重に重ねニードルパンチングし、編み目がほとんどわからない状態の不織布化した。これを100℃で5分間熱プレスし毛羽立ちやほつれをなくした。

② 上記のPGA不織布を10cm四方に裁断し、両面をプラズマ照射装置で各5分間処理し親水化した。

③ 豚皮由来酵素可溶性コラーゲン1%溶液(pH3.0)50mlを、攪拌装置にて3000rpmで5分間攪拌し発泡化し、上記のPGA不織布の片面に塗布した後、アンモニア雰囲気下で30分中和処理しコラーゲンをゲル化した。

④ 中和処理後、蒸留水中でよく洗浄しアンモニアを除き、ただちに凍結乾燥を行い、多孔質状のコラーゲン層で被覆されたPGA不織布を得た。凍結乾燥後、さらに105℃で12時間、真空下で熱処理を行い、本発明の医用材料(以下、コラーゲン-PGA複合材料という)を得た。

#### 【0012】試験例1

本発明の医用材料の有用性を試験するため、体重約2kgの雄日本白家兎14羽で、膀胱半分を切除し、欠損部補填術(膀胱再建術)を施行した。なお、膀胱再建術で試験したのは、膀胱は再建が困難な臓器であり、膀胱の再建が可能であれば、医用材料としてほとんど全ての軟組織への応用が可能であることが知られていることに基づく。試験方法をより詳細に説明すると、膀胱頂部を部分切除した後、実施例1で調製したコラーゲン-PGA複合材料(3cm×3cm)を、コラーゲン被覆層が膀胱内面となるように、5-0クロミックカットガットを用いて連続縫合で膀胱壁とwater-tightに縫合した。尿道内に6Fr.ポリエチレンカテーテルを残置し、感染予防のため術中抗生物質(硫酸アミカシン20mg)を腹腔内及び膀胱内に散布した。再建術後、2~12週で屠殺し、肉眼的及び病理組織学的に検討した。その結果を表1に示す。

【0013】

【表1】

表1

観察期間 週	動物番号 No.	肉眼所見			病理所見	
		結合線による被覆	材料の吸収	結石形成	粘膜再生	筋層再生
2	1	+	-	-	-	-
	2	+	-	+	-	-
3	3	+	-	-	-	-
	4	+	-	+	-	-
4	5	+	-	-	-	-
	6	+	-	-	-	-
7	7	+	+	-	+	-
	8	+	+	-	+	+
8	9	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
9	11	+	+	-	+	+
	12	+	+	-	++	++
12	13	+	+	-	++	++
	14	+	+	+	+	+

【0014】表1に示されるように、観察経過中に死亡した例はなく、PGA-コラーゲン複合材料の脱落も認められなかった。2週間後には結合線の被覆が認めら

れ、7週間後にはPGA-コラーゲン複合材料の吸収がはじまり、12週間後には完全に吸収され、その間に新生膀胱が拘縮することなく再生した。病理組織学的検討

から、新生膀胱の内腔は粘膜で被覆されており、また筋層の再生も認められ良好な状態であった。一部の試験動物で膀胱結石の形成が認められたが、過去に報告されている研究に比べて少ない発生率であった。以上のことより、本発明の医用材料が、膀胱拡大術や尿道下裂術後尿道瘻の修復などに臨床応用できることが示された。

【0015】

【発明の効果】本発明の医用材料は、生体内分解吸収性材料とコラーゲン被覆層との層構造を有し、生体内に移植した際に、宿主細胞がコラーゲン被覆層に侵入し、増

殖して自己修復が行われる。その間、生体内分解吸収性材料は機械的強度を維持し、自己修復を支持する。そして、移植の目的が達成された後には、コラーゲン及び生体内分解吸収性材料は吸収されてしまい、生体内に異物として残存することがないので、従来の合成高分子材料のように肉芽形成、炎症などの障害を生ずることがない。従って、本発明によれば、極めて安全性が高く且つ利用範囲の広い医用材料を得ることができるという効果を奏する。

---

フロントページの続き

(72)発明者 羽多 實  
茨城県つくば市緑ヶ原3丁目3番 日本ハム株式会社中央研究所内  
(72)発明者 高澤 弘明  
京都府綾部市延町鳥居15-16

(72)発明者 岡 高茂  
京都府船井郡丹波町周知藤の森33  
(72)発明者 武田 正之  
新潟県新潟市関屋恵町12番15号





## Partial English Translations

JP 6-292716A

Claim 3: The medical material according to claim 1 or claim 2, wherein the layer of collagen coating is porous.

Page 2, second column, lines 7-12: Thus, collagen possesses excellent characteristics as an ingredient in medical materials, and collagen sponge, in which collagen is made porous, is a particularly useful material since cells can penetrate into the layer of collagen coating, multiplying vigorously and effecting tissue regeneration. It has already become clear that collagen sponge may be used in the treatment of wounds and so on.

Page 2, second column, lines 14-32: [Problems to be Solved by the Invention]

However, collagen sponge has low mechanical strength and its range of usage is limited. Generally, it is difficult to produce materials with high cell penetrability and proliferation and a certain amount of mechanical strength, using collagen alone. Conventionally, therefore, collagen has been used as composites with synthetic polymers (such as silicone). However, when such materials are implanted inside the body, the synthetic polymer material remains in the body as foreign matter, and is often the cause of undesirable disorders such as ongoing tissue reaction. Consequently, it is desirable that the synthetic polymer materials ultimately be extracted, but this extraction necessitates further surgery or

endoscopic surgery, and at worst may be impossible depending on the grafting region. Due to such problems, regardless of the fact that collagen possesses excellent characteristics as an ingredient in medical materials, cases of usage have been few. The present invention has been designed in order to solve these problems in the background art, and it is an object of the present invention to provide medical material which is absorbable in the body following grafting, and which is capable of exhibiting the effectiveness of collagen.

Page 3, upper left column, lines 3-11: The structure of these materials is exemplified by, for example, film, sheet, mesh sheet, woven fabric, nonwoven fabric, and so on, and the manufacturing method for these materials is explained in detail in Japanese Patent Application Laid-Open No. S57-98556, Japanese Patent Publication No. H5-18579 and so on. As to the structure of the materials, from the point of view of ease of formation of the layer of collagen coating, biodegradability, flexibility and so on, nonwoven fabric, woven fabric and mesh sheet (preferably with a hole diameter of up to 200 to 300 $\mu$ m) can be suitably used.

Page 5, 7th column, line 8 - 8th column, line 7: [Effects of the Invention]

The medical material of the present invention has a layered construction of a biodegradable absorbable material and a layer of collagen coating. When implanted inside the body, host cells penetrate into the layer of collagen coating and multiply so that self-healing is performed. Meanwhile, the biodegradable absorbable material retains its mechanical strength and supports self repair. Also, once the aim of the implantation has been achieved, the collagen and the biodegradable, absorbable material are completely absorbed and do not remain inside the body as

foreign matter. There is therefore no occurrence of the disorders, such as granulation, inflammation and so on, that are associated with conventional synthetic polymer materials.

JP 3-23864 A

Claim 1: A filler for biological tissue comprising a composite material of collagen sponge and a biodegradable absorbable high molecular material.

Claim 2: The filler for biological tissue according to claim 1, wherein the fibrous biodegradable absorbable high molecular material is mixed or embedded into the collagen sponge.

Page 1, bottom right column, the bottom line – page 2, upper left column, line 4: The present invention has been designed to solve these conventional problems, and to provide a new filler with little tissue response, which promotes the growth of fibroblasts, which retains its shape and strength over a long period of time, and which is absorbed into the body after recovery.

Page 2, upper left column, lines 13-19: The present invention is compounded by mixing poly-L-lactic acid, which has a slow decomposition rate in the body, into collagen sponge, whereby the pores in the sponge structure can be maintained over a long period of time. Furthermore, through compounding fibrous poly-L-lactic acid, the growth of fibroblasts

into the interior [of the sponge] is promoted, and the strength and shape [of the filler] can be maintained for the length of time necessary for recovery.

Page 3, upper left column, lines 3-11: (Effects of the Invention)

As is clear from the results of practical use, the filler according to the present invention described above comprises all of the necessary functions for this kind of application - such required characteristics as: no tissue responses; promoting fibroblast growth; maintaining its strength and shape over a long period of time until tissues are regenerated; performing a function of preventing the contracture of tissues; and disappearing through absorption into the body following tissue regeneration - and can thus be applied effectively.

JP 1-230366 A

Claim 6: A medical material penetrable by cells, wherein a cross-linked collagen film or a porous body is covered by a modified collagen solution with a 0-80% helical content.

Page 2, upper left column, lines 7-12: The latter line of thought, in which in vitro derived material such as collagen is selected as an artificiality, and cells with a tissue restoration function, such as fibroblasts, are allowed to penetrate [therein] at an early stage to create tissue such as connective tissue which covers the objective tissue, thereby staving off an immunoreaction, is closer to the ideal.

Page 2, upper right column, the bottom line - page 2, bottom left column, line 5: An object of the present invention is to provide medical material which possesses resistance to enzymatic decomposition inside the body when covering the surface of a wound or implanted inside the body, which retains the necessary mechanical strength for a fixed period of time, and which has a good affinity with cells and tissue so that multiplied cells can easily penetrate into the interior thereof.

Page 4, upper left column, line 14 - page 4, bottom right column, line 2: Experimental Example 1: Experiment to test the ability of cells to penetrate an atelocollagen - modified atelocollagen matrix in vitro.

Dermal fibroblasts of laboratory rats were used to perform an in vitro culture experiment to evaluate the cell penetrability of the matrix obtained in the above Example 1 and Comparative Example 1.

One collagen sponge with a diameter of 3.5cm was placed on a 60mm sterile Petri dish (manufactured by Terumo), 1ml of fibroblasts at a density of  $1 \times 10^6$  units/ml was dripped onto the sponge and cultured for 24 hours at 37°C. 3ml of DME Medium including 10% FBS was added and [the cells were] cultured for 6 days at 37°C.

Following fixing with 10% neutral buffered formalin fixative, the cells were stained, inspected with an optical microscope and evaluated. The results of the evaluation are shown in Table 1.

Table 1

Experiment to test the ability of cells to penetrate a collagen matrix in vitro

Sample	Cell Penetrability	Shape Maintaining Quality of Sponge
A C	—	##
AC — 20 wt% HAC	±	##
AC — 33 wt% HAC	##	##
AC — 50 wt% HAC	##	##
AC — 67 wt% HAC	##	##
AC — 80 wt% HAC	##	+

Notes: Cell Penetrability

- None

± Mildly Penetrable

+ Penetrable on Small Scale

++ Penetrable on Medium Scale

+++ Extremely Penetrable

Shape Maintaining Quality of Sponge

- Disappears (Dissolves)

± Almost dissolves

+ Test specimen remains but shape is changed considerably

++ Small scale contracture/dissolving

+++ No change in shape

It can be understood from Table 1 that a matrix into which HAC is mixed has a greatly improved cell penetrability in comparison to a purely AC matrix. However, from the point of view of maintaining the form of the sponge, it is preferable that the percentage by weight of HAC be less than 80%.

Page 5, upper left column, line 7 - page 6, upper left column, line 5 from the bottom:

Experimental Example 2: Experiment to test the ability of cells to penetrate a fibrilised atelocollagen – modified atelocollagen matrix.

Using the same operations as experimental example 1, fibroblasts of laboratory rats were used to perform an in vitro culture experiment to evaluate the cell penetrability of the matrix obtained in the above Example 2 and Comparative Example 2.

The results of the evaluation are shown in Table 2.

Table 2

Experiment to test the ability of cells to penetarate a collagen matrix  
in vitro

Sample	Cell Penetrability	Shape Maintaining Quality of Sponge
F C	+	##
FC – 10 wt% HAC	++	##
FC – 20 wt% HAC	##	##
FC – 50 wt% HAC	##	##

As can be seen from Table 2, in a matrix with FC as a base material, the shape maintaining quality of all the sponges is good, providing excellent stability. As for the cell penetrability, with FC alone, slightly uneven cell pentration can be observed, but when HAC is added, an extremely large amount of cells are assimilated and also uniformly distributed, and the shape of the sponge, while being of an in vitro culture experiment type, closely resembles in vivo biological tissue.

Experimental Example 3: Experiment to test the in vitro subcutaneous implantation of a fibrilised atelocollagen – modified atelocollagen matrix

The matrix manufactured in Example 2 and Comparative Example 2 was embedded under the skin of a laboratory rat, and the findings were studied pathologically.

A female rat of around 200g and of the wistar – KY type was used in the subcutaneous implantation (embedding). Prior to embedding, and following anesthesia with five-fold diluted Nembutal, the dorsal surface of the rat was moistened with Isodine surgical scrub (manufactured by Meiji Pharmaceuticals K.K.), and the dorsal surface was shaved carefully using a fur razor, ensuring that no fur remained. Thereafter, the dorsal surface was disinfected with Isodine and ethanol. Incisions were opened so as to create voids in each of the incisions inside the areolar tissue beneath the cutaneous muscle of the rat (however, care was taken such that adjacent incisions did not come into mutual contact). The test specimen was inserted into the voids, and the entire test specimen was laid flat on its side. The incisions were sewn up with a square needle and nylon thread. The incisions were sewn up with three stitches. The same test specimen was implanted into another rat.

The animals were killed with ether or twice-diluted Nembutal 3 and 28 days after implantation. Ensuring that the implantation test specimen was retained in the tissue, a section of subcutaneous tissue of 8cm x 12cm or greater was cut away from the dorsal muscle of the rats. This tissue was placed in a 10% neutral buffered formalin solution, and after being left to stand for one day and fixed, a histopathological examination was undertaken.

The histopathological examination began with the removal of the test specimen from the tissue. To ensure that the test specimen was



definitely contained in the tissue, a strip of tissue of around 0.5cm x 2.5cm was cut away. This was permeated through ethanol and then xylene, and finally displaced in paraffin. Following displacement, the tissue containing the test specimen was placed in a solid paraffin heat solvent and cooled rapidly until paraffin embedding was complete. The embedded tissue was then thinly sectioned in a rotary microtome manufactured by Yamato K.K. to form paraffin sections of a thickness of 4 $\mu$ m. Having removed the paraffin, histopathological staining was performed using an arbitrary staining method, thereby completing the preparation. Hematoxyline-eosine (H-E) stain, azane stain, resorcin/fuchsin stain, and so on may be employed as the histopathological stain. The results are as shown in Table 3.

Table 3  
Histopathological changes in an experiment to test subcutaneous  
implantation

Sample	Change in Tissue		
	After 3 days		After 28 days
	Neutrophil Infiltration	Fibroblast Assimilation	Contracture of granulation tissue
<b>FC</b>	##	++	##
FC - 10 wt% HAC	+	##	+
FC - 20 wt% HAC	++	##	+
FC - 50 wt% AC	##	++	+

With only FC, neutrophil infiltration is strong and fibroblast assimilation is moderate after 3 days, whereas after 28 days, the prepared granulation tissue contracts. Conversely, when HAC is added from 10 to

20 % by weight, neutrophil infiltration is weak after 3 days, whereas fibroblast assimilation has improved to a higher level. It can also be seen that the contracture of granulation tissue has eased considerably after 28 days.

JP 63-272355 A

Claim 3: The graft according to claim 1 or claim 2, wherein a matrix comprises: a biodegradable organic polymeric fibrous material with a loose fibrous structure and/or a fibrous aggregate structure; and/or a biodegradable first granular material.

Page 3, upper left column, the bottom line - page 3, upper right column, line 3: The fibrous material which serves as a reinforcement and/or a tissue growth stimulant has a loose fibrous structure, and can also be incorporated into the matrix in the form of a textile, knitted fabric, or another fibrous aggregate body.

Page 3, bottom left column, lines 13-16: The composite first granular material according to the present invention, which serves as a reinforcement and/or a tissue growth stimulant, can be incorporated into the matrix in the form of a loose granular body.

JP 63-255068 A

Claim 1: An implant of foamed plastic molding with interconnected pores which is based on a resorbable polyester such as poly-p-dioxanone, polyhydroxycarboxylic acid, polylactides or polyglycolides and the copolymers thereof, wherein one or more types of fabric reinforcing elements, formed from resorbable plastic, are embedded in a plastic matrix having interconnected pores with a pore diameter of 10 to 200 $\mu$ m.

Page 3, bottom left column, lines 6-11: It is surprising to see that by incorporating a resorbable plastic fibrous reinforcing member such as a textile, thread, plaid, or knitted material, the mechanical strength of the foamed molding is greatly improved without altering the porous quality, flexibility and elasticity thereof.

## Concise statements of relevancy

JP 2-167156A discloses a tubular implant which is a reabsorbable material, comprising a woven or knitted tube (2), in which filaments or fibers are

- a) wholly or partly comprised of two or more kinds of reabsorbable materials (2a, 2b) with different melting points, or
- b) comprised of one kind of reabsorbable material (2a) and wholly or partly covered or coated with an inner or outer film layer (10) of another reabsorbable material,

wherein the tube is molded into a tubular complex or strengthened after heated to a temperature, which is not lower than the melting point of the reabsorbable material (2b) with a lower melting point and not higher than the melting point of other reabsorbable material (2a) with a higher melting point.